

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 29 130.6

Anmeldetag: 25. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum, Tübingen/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur Behandlung
von Milch, insbesondere von Muttermilch

IPC: A 23 C 3/03

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A stylized, handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping loop followed by a horizontal line.

Ozierzon

Anmelder:

24. Juni 1999
5402P174 HO-km

Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum
Geissweg 3

D-72076 Tübingen

Verfahren und Vorrichtung zur Behandlung von Milch,
insbesondere von Muttermilch

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Milch, insbesondere von Muttermilch, bei dem die Milch in einem Behälter kurzzeitig erhitzt wird.

Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Derartige Verfahren und Vorrichtungen sind allgemein aus dem Stand der Technik bekannt. Sie dienen dazu, zur Lagerung oder

späteren Verwendung bestimmte Milch oder Muttermilch haltbar zu machen und/oder infektiöse Mikroorganismen aus der Milch zu entfernen. Derartige Verfahren sind z.B. unter dem Begriff Pasteurisierung bekannt.

Es ist inzwischen allgemein anerkannt, daß die Ernährung mit Muttermilch für einen Säugling nicht nur Vorteile bezüglich der Ernährung selbst, sondern auch immunologische Vorteile bietet, denn die Muttermilch enthält neben Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten unter anderem die Inhibine Lysozym, Laktoferrin, Neuraminsäure und spezifische Immunglobuline, vor allem sIgA. Aus diesem Grund sind gestillte Kinder gegenüber Infektionen und Allergenen in geringerem Maße anfällig als nicht gestillte Kinder.

Gerade für Frühgeborene hat daher die Ernährung mit Muttermilch so große Vorteile, daß unter anderem aus diesem Grund in den 80er Jahren Milchbanken eingerichtet wurden, in denen Muttermilch aufbereitet und für eine spätere Verwendung gelagert wurde. Die Milch verschiedener Spenderinnen wurde dazu gepoolt und dann einer Hitzeinaktivierung bzw. einer Kryoinaktivierung unterzogen. Aus Sicherheitsgründen ist das System der Milchbanken heute weitgehend wieder aufgegeben worden, da zur Vermeidung von Infektionen eine eindeutige Zuordnung zwischen dem Säugling und der Muttermilch der eigenen Mutter unabdingbar ist. Auf diese Weise soll eine unkontrollierte Übertragung von Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis etc. vermieden werden.

Für die Ernährung von Frühgeborenen bedeutet dies nun jedoch, daß die Muttermilch der eigenen Mutter abgepumpt, aufbereitet und im Krankenhaus und/oder zuhause zwischengelagert werden

muß, denn aufgrund der Unreife und der geringen Nahrungsaufnahmekapazität und der damit verbundenen häufigen Fütterung können diese Frühgeborenen nicht gestillt werden. Hinzu kommt, daß Frühgeborene häufig drei bis vier Monate in der Klinik verbleiben, während die Mütter schon kurze Zeit nach der Geburt entlassen werden, so daß im Krankenhaus entsprechende Vorräte an Muttermilch vorhanden sein müssen, um eine kontinuierliche Ernährung der Frühgeborenen sicherzustellen. Technisch bedeutet dies, daß auch kleine Volumina von z.B. 20 ml aufbereitet und individuell gelagert werden müssen.

Während durch Verzicht auf Stillen die vertikale Transmission von HIV, Hepatitis und weiteren Infektionskrankheiten beherrschbar geworden ist, gilt dies nicht für Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (im folgenden: CMV), die gegenwärtig zur häufigsten Pränatalinfektion zählt. Bei ca. 10 - 20 % aller Neugeborenen kommt es darüber hinaus zu einer perinatalen Infektion durch Muttermilch. Der Krankheitsverlauf kann sehr schwer und insbesondere bei Frühgeborenen letal sein.

Vochem et al., Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk, *Pediatr Infect Dis J*, 1998, Band 17, Seiten 53-58, berichten in diesem Zusammenhang über eine klinische Studie, in der das Risiko der Übertragung von CMV durch Muttermilch auf Kinder mit einem Geburtsgewicht unterhalb 1500 g oder einem Schwangerschaftsalter von weniger als 32 Wochen untersucht wurde. Ca. 50 % der Mütter waren CMV-seropositiv, wobei 85 % dieser seropositiven Mütter CMV über die Muttermilch absonderten, wie durch eine Untersuchung der zellfreien Molke nachgewiesen werden konnte. Im Laufe der Stu-

die infizierte sich mehr als die Hälfte der von CMV-seropositiven Müttern gestillten Frühgeborenen mit CMV.

Aufgrund der Tatsache, daß die Autoren infizierte Muttermilch als einzige Quelle für die Übertragung von CMV identifizieren konnten, schlagen sie vor, CMV in abgepumpter Muttermilch zu inaktivieren, um die Übertragung zu verhindern und eine frühe und damit häufige symptomatische Infektion bei Frühgeborenen zu vermeiden.

Neben den klassischen Methoden der Holder-Pasteurisierung und der Kryoinaktivierung schlagen die Autoren vor, infizierte Muttermilch kurzzeitig für zehn Sekunden auf 72°C zu erhitzen, ohne jedoch das von ihnen angewandte Verfahren genau zu beschreiben. Sie berichten, daß sie nach einer derartigen Kurzzeiterhitzung keine Spuren von infektiösen Viren mehr nachweisen konnten.

In einer frühen Studie beschreiben Goldblum et al., Rapid high-temperature treatment of human milk, The Journal of Pediatrics, 1984, Band 104, Seiten 380-385, eine Kurzzeit-Pasteurisierung von Muttermilch, durch die die Zahl von Bakterien und CMV stark reduziert wurde, ohne viele der für die Immunologie und Ernährung wichtigen Inhaltsstoffe zu zerstören. Gemäß dem bekannten Verfahren wird Milch von mehreren Spenderinnen gepoolt (1,2 bis 2 l) und mittels eines Plattenwärmetauschers aufgeheizt. Da der Wärmetauscher für die Behandlung großer Volumina von Kuhmilch ausgelegt war, wurde die gepoolte Humanmilch in einen kontinuierlichen Strom von sterilem destilliertem Wasser injiziert und für fünf Sekunden auf 72°C erhitzt, wobei die gewünschte Temperatur in weniger als drei Sekunden erreicht wurde. Anschließend

wurden die Proben innerhalb von drei Sekunden auf 2°C abgekühlt.

Wegen der Verwendung eines in der Milchindustrie üblichen Gerätes mit dem erforderlichen hohen Probenvolumen wird das bekannte Verfahren den eingangs erwähnten modernen Anforderungen nach der Behandlung kleiner Probenvolumina nicht gerecht.

In einer weiteren frühen Arbeit berichten Dworsky et al., Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage, The Journal of Pediatrics, 1982, Band 101, Seiten 440-443, daß eine Holder-Pasteurisierung, also eine Erhitzung der Milch für 30 Minuten auf 62°C zu einer vollständigen Eliminierung von CMV in CMV-seropositiver Milch führt. Sie erwähnen jedoch, daß diese Behandlung nicht ideal ist, wenn die immunologischen Eigenschaften der Milch erhalten werden sollen. Die daher untersuchte Pasteurisierung mit einer niedrigeren Temperatur, nämlich 56°C, zeigte jedoch keine zufriedenstellende Eliminierung von CMV aus infizierter Milch.

Ebenfalls nicht zufriedenstellende Ergebnisse erzielten die Autoren mit einer Kryoinaktivierung, bei der die Proben über Nacht bei -20°C gelagert wurden.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das eingangs erwähnte Verfahren sowie die eingangs erwähnte Vorrichtung dahingehend weiterzubilden, daß die Milch auf einfach und schnell durchzuführende Weise auch in kleinen Mengen derart behandelt werden kann, daß infektiöse Mikroorganismen, insbesondere CMV, zuverlässig inaktiviert werden, wobei

die erwünschten Inhaltsstoffe vorzugsweise größtenteils erhalten bleiben.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe bei dem eingangs erwähnten Verfahren dadurch gelöst, daß der Behälter zumindest während des Erhitzens derart in Bewegung gesetzt wird, daß sich an seiner Innenwand ein Milchfilm ausbildet.

Bei der eingangs erwähnten Vorrichtung wird diese Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zumindest eine Wärmequelle zum Aufheizen der Milch sowie eine Vorrichtung vorgesehen sind, um den Behälter in Bewegung, vorzugsweise in Rotation zu versetzen und den sich bewegenden Behälter der Wärmequelle für eine bestimmte Zeitspanne auszusetzen.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß durch die Bewegung des Behälters während der Hitzeeinwirkung die Entstehung von internen Temperaturgradienten verhindert wird, da das gesamte Milchvolumen gleichmäßig erhitzt wird. Dies bedeutet jedoch, daß keine Denaturierung von Inhaltsstoffen stattfindet und ein Großteil der immunologischen Eigenschaften der Milch erhalten bleibt. Andererseits konnten die Erfinder eine vollständige Inaktivierung von infektiösen Mikroorganismen, insbesondere von CMV sowie auch von z.B. *Staphylococcus aureus* feststellen. Auch ein Einsatz im Veterinärbereich z.B. in zoologischen Gärten und bei seltenen Säugetieren ist möglich.

Das neue Verfahren sowie die neue Vorrichtung sind darüber hinaus besonders für sehr kleine Milchmengen geeignet, denn eine lokale Überhitzung der Milch wird durch die Bewegung des Behälters verhindert.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die Milch für höchstens ca. 20 Sekunden auf oberhalb von mindestens ca. 65°C erhitzt wird, wobei der Behälter zumindest während des Erhitzens vorzugsweise in Rotation versetzt wird mit einer Drehzahl oberhalb von ca. 150 U/min, vorzugsweise oberhalb von ca. 250 U/min, weiter vorzugsweise von ca. 300 U/min.

Die Erfinder haben festgestellt, daß derartige Rotationsgeschwindigkeiten zur Ausbildung eines sehr gleichmäßigen Milchfilmes an der Innenseite des Behälters führen, wobei die eingesetzten Temperaturen und Zeiten für eine garantierte Eliminierung selbst hoher Virusdosen in kleinen individuellen Milchmengen sorgen.

Zwar wäre es auch möglich, die Milch in dem Behälter durch Rühren selbst in Bewegung zu versetzen, die mechanische Agitation der Milch könnte jedoch zu einer Zerstörung der Milchzellenstruktur führen, was bei einer Bewegung, vorzugsweise Rotation des Behälters, so nicht der Fall ist.

Allgemein ist es bevorzugt, wenn der Behälter/die Muttermilch zum Aufheizen für eine erste Zeitspanne einer auf eine erste Temperatur eingestellten ersten Wärmequelle, dann für eine zweite Zeitspanne einer auf einer zweiten Temperatur befindlichen zweiten Wärmequelle und schließlich zum Abkühlen für eine

dritte Zeitspanne einer auf eine dritte Temperatur eingestellten dritten Wärmequelle ausgesetzt wird.

Bei diesem Ausführungsbeispiel ist von Vorteil, daß sich die Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeit der Milch individuell so einstellen läßt, daß eine Denaturierung von Inhaltsstoffen durch sprungartige Temperaturänderungen vermieden wird. Auf optimale Weise ist so eine langsame Anwärmphase wählbar, die auch bei kleinen Milchmengen für eine schonende und gleichmäßige Aufheizung sorgt.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die erste und/oder dritte Wärmequelle ein Wasserbad aufweisen, in das der bewegte Behälter eingetaucht wird.

Auch diese Maßnahme sorgt für eine gleichmäßige Temperatur in der behandelten Milch. Zwar wäre es auch denkbar, die Milch über Kühl-/Heizschlangen zu temperieren, insbesondere bei kleinen Milchmengen würde dies jedoch zu lokalen Temperaturgradienten und damit zu einer Denaturierung von Inhaltsstoffen führen. Darüber hinaus sind Kühl-/Heizschlangen schwer zu sterilisieren, wobei dieses Problem bei den nur außen mit den Behältern in Kontakt gelangenden Wasserbädern nicht auftritt.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die zweite Wärmequelle die Umgebungsluft ist.

Diese Maßnahme ist konstruktiv von Vorteil, denn auf ein drittes Wasserbad kann nach Erkenntnis der Erfinder verzichtet werden, so daß das neue Verfahren in einer Vorrichtung mit lediglich zwei Wasserbädern durchgeführt werden kann.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die erste Temperatur größer als 80°C ist und vorzugsweise ca. 85-90°C beträgt, die zweite Temperatur kleiner als 10°C ist und vorzugsweise ca. 2-4°C beträgt, die erste Zeitspanne größer als 15 Sekunden ist und vorzugsweise ca. 20-25 Sekunden beträgt, die zweite Zeitspanne kleiner als 15 Sekunden und vorzugsweise ca. 5-10 Sekunden beträgt, sowie die dritte Zeitspanne größer als 10 Sekunden ist und vorzugsweise ca. 20 Sekunden beträgt.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben erkannt, daß bei diesen Temperaturen und Zeitspannen nicht nur die Eliminierung selbst sehr hoher Virusdosen in kleinen Milchmengen von 20 ml garantiert wird, sondern daß die weitgehende strukturelle Integrität der Milchzellen gewährleistet wird, was durch mikroskopische Prüfung mittels Vitalfärbung und LDH-Freisetzung in Molke nachgewiesen wurde. Ferner zeigt das neue Verfahren keine Reduktion des Gesamteiweisses und des Albumins in der Molke an. Zwar ist die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der Lipase temperatursensitiv, die Lipaseaktivität, der eine Schlüsselrolle bei der Fettresorption im Frühgeborenenintestinum zugeschrieben wird, ist bei dem neuen Verfahren jedoch um ca. den Faktor 3 größer als nach einer Holder-Pasteurisierung (30 Minuten, 62°C). Darüber hinaus wird die Konzentration der Vitamine B12 und Folsäure nicht reduziert, wobei ferner die Konzentration von sIgA nur geringfügig reduziert wird.

Insgesamt bedeutet dies, daß im Gegensatz zu den aus der Literatur bekannten Verfahren durch das neue Verfahren auch kleine Mengen an Milch auf sehr schnelle, aber dennoch schonende Weise zuverlässig so aufbereitet werden können, daß eine vollständige Inaktivierung insbesondere von CMV erfolgt, wichtige Inhaltsstoffe jedoch erhalten und größtenteils aktiv bleiben.

Dabei ist es dann noch bevorzugt, wenn der Behälter ein Glaskolben, vorzugsweise ein Glasrundkolben ist.

Hier ist von Vorteil, daß derartige Glaskolben leicht zu sterilisieren und preiswert sind, wobei ferner aufgrund der begrenzten Wärmeleitfähigkeit des Glases ein lokales Aufheizen der aufgenommenen Milch beim Eintauchen in das Heizbad verhindert wird, was ebenfalls auf vorteilhafte Weise eine unerwünschte Denaturierung gerade bei kleinen Milchmengen vermeidet.

Weiter ist es noch bevorzugt, wenn der Behälter ein Volumen aufweist, das mindestens ca. zehnmal größer ist als das Volumen der Milch.

Hier ist von Vorteil, daß sich insbesondere in einem rotierenden Behälter bei derartigen Volumenverhältnissen ein gleichmäßiger, günstig verteilter Milchfilm ausbildet, der die beschriebene zuverlässige Inaktivierung unter Beibehaltung der Schutzwirkung und Ernährungsfunktion der Milch erlaubt.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

In der einzigen Figur ist eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung gezeigt, die in der nachfolgenden Beschrei-

bung im Zusammenhang mit experimentellen Beispielen näher erläutert wird.

Beispiel 1: Kurzzeithitzeinaktivierung von Muttermilch

Nativmilch von stillenden, CMV-seronegativen Müttern wird abgepumpt und in 20 ml-Proben aliquotiert. Zu dieser Probe wird eine definierte Virusmenge vom Virusstamm CMV AD 169 zugesetzt, um Milchproben mit definierter Viruslast herzustellen.

Zu diesem Zweck wurden zwei virushaltige Lösungen erzeugt, die von einem Kulturüberstand nach Zentrifugation 1000 x g ausgehen:

- a) 5 ml des Kulturüberstandes werden direkt bei -70°C kryokonserviert.
- b) Der Kulturüberstand wird in 1,5 ml-Hütchen gegeben und nach einer Viruspelletierung (30 min bei 25000 x g) 1,4 ml Überstand verworfen. Das Pellet wird jeweils in 100 μl Überstand resuspendiert, gepoolt und in 100 μl Proben ebenfalls bei -70°C kryokonserviert.

Für beide Lösungen betrug die $\text{TCID}_{50}/100 \mu\text{l}$ (Tissue Culture Infective Dose 50 %), also die Verdünnungsstufe, bei der noch 50 % der angeimpften Mikrokulturen (mindestens acht Replika) einen positiven Virungsnachweis ergeben, jeweils $10^{-5.876}$.

Darüber hinaus wurde die Muttermilch einer CMV-seropositiven stillenden Mutter getestet.

Die so erzeugten Proben werden zum einen in einer in der einzigen Figur gezeigten Vorrichtung 10 einer Kurzzeithitzebehandlung unterzogen.

Zu diesem Zweck umfaßt die Vorrichtung 10 zwei Wasserbäder 12 und 13, über denen sich auf zwei Pfosten 14, 15 abgestützt ein Portalbalken 16 erstreckt. An dem Portalbalken 16 ist verschiebbar ein Wagen 17 gelagert, der über einen Motor 18 in Richtung eines Doppelpfeiles 19 verfahrbar ist.

An dem Wagen 17 ist eine in Richtung eines Doppelpfeiles 20 höhenverstellbare Stange 21 vorgesehen, die in ihrer Hubbewegung über einen Motor 22 gesteuert wird, der ebenfalls an dem Wagen 17 gelagert ist.

An ihrem unteren Ende trägt die Stange 21 einen Drehhalter 23, in den ein Glaskolben 24 eingespannt ist. An ihrem oberen Ende weist die Stange 21 einen Motor 25 auf, über den der Glaskolben um seine Hochachse 26 in Rotation versetzt werden kann, was durch einen Pfeil 27 angedeutet ist.

An der Stange 21 ist ferner noch ein Temperaturfühler 28 befestigt, der in den Glaskolben 24 hineinragt und an dessen Innenwand 29 anliegt.

In dem Glaskolben 24 befindet sich eine wie oben vorbereitete Probe zu behandelnder Muttermilch 32, die ein Volumen von ca. 20 ml aufweist, wobei bei 33 das Volumen im Stillstand des Glaskolbens 24 angedeutet ist.

Wenn der Glaskolben 24 durch den Motor 25 in Rotation versetzt wird, bildet die Muttermilch an der Innenwand 29 des Glaskolbens 24 einen bei 34 angedeuteten Milchfilm aus, der etwa die Hälfte der Innenwand 29 bedeckt. Diese Ausbildung des Milchfilmes wird dadurch erreicht, daß der Glaskolben 24 ca. das zehnfache Volumen wie die Muttermilch 32 aufweist, im vorgegebenen Fall ein Volumen von 250 ml (Glasrundhalskolben mit Schliff), der mit einer Drehzahl von ca. 300 U/min rotiert.

Über die Motoren 18 und 22 kann der Glaskolben 24 jetzt in eines der beiden Wasserbäder 12, 13 eingetaucht werden, wobei die Eintauchtiefe so gewählt wird, daß der Glaskolben 24 bis zu seinem Hals 35 in das Wasser des jeweiligen Wasserbades 12 oder 13 eingetaucht wird.

Die Ablaufsteuerung erfolgt über eine Steuerschaltung 36, mit der sowohl die Motoren 18, 22 und 25 als auch der Temperaturfühler 28 verbunden sind, der im Experimentierstadium die jeweilige Temperatur der Muttermilch anzeigt.

Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß beim Einsatz der neuen Vorrichtung in einer Klinik auf einen Temperaturfühler verzichtet werden kann, da eine Vielzahl von Experimenten erwiesen hat, daß bei vorgegebenen Temperaturen und Verweildauern der Temperaturverlauf in der Muttermilch 32 reproduzierbar ist. Der Verzicht auf den Temperaturfühler 28 hat darüber hinaus den Vorteil, daß keine besonderen Maßnahmen zur Sterilisierung des Temperaturfühlers verwendet werden müssen, um eine Kreuzkontamination zwischen nacheinander behandelten Milchproben zu verhindern. Der Glaskolben 24 kann darüber hinaus auf

einfache Weise sterilisiert werden, so daß insgesamt die Gefahr der Kreuzkontamination vermieden wird.

Das neue Verfahren läuft nun derart ab, daß zunächst in einen frischen Glaskolben 24 die gewünschte Menge von Muttermilch, in dem gewählten Beispiel also 20 ml eingegeben wird. Der Glaskolben 24 wird dann in den Drehhalter 23 eingespannt und mittels des Motors 25 mit einer Drehzahl von ca. 300 U/min in Rotation versetzt, so daß sich der Milchfilm 34 ausbildet.

Dann wird durch Verfahren der Motoren 18 und 22 der Glaskolben 24 zum Zwecke des raschen Wärmeaustausches bis zu seinem Hals 35 in das Wasserbad 12 eingetaucht, das auf 85-90°C erhitzt ist.

Der Glaskolben 24 verbleibt für 20/25 Sekunden in dem Wasserbad 12 und wird dann automatisch wieder ausgehoben. Die Temperatur des Milchfilmes liegt dann bei 68/70°C.

Daraufhin wird der immer noch rotierende Glaskolben 24 für fünf Sekunden der Luft ausgesetzt, wobei durch den Wärmeaustausch mit der Umgebung der Milchfilm eine Zieltemperatur von ca. 72°C erreicht.

Danach wird der Glaskolben 24 dann in das Wasserbad 13 eingetaucht, das eine Temperatur von 2-4°C aufweist. Hier verbleibt der immer noch rotierende Glaskolben 24 für ca. 20 Sekunden, woraufhin die Muttermilch 32 wieder eine Temperatur von ca. 30°C eingenommen hat.

Der ganze Inaktivierungszyklus dauert also lediglich ca. eine Minute, so daß die neue Vorrichtung auch für Kliniken geeignet ist, wo viele individuelle Milchproben nacheinander und ohne Gefahr der Kreuzkontamination hitzeinaktiviert werden müssen. Da - wie bereits erwähnt - im Klinikalltag eventuell kein Temperaturfühler 28 erforderlich ist, bzw. der Temperaturfühler 28 nur zeitweise zur Überprüfung des Verfahrens verwendet wird, muß nach der Behandlung einer ersten Milchprobe lediglich der Glaskolben entnommen und durch einen neuen, mit einer neuen Milchprobe gefüllten Glaskolben ersetzt werden. Auf diese Weise können schnell nacheinander eine große Zahl von Milchproben inaktiviert werden.

Die so behandelten Milchproben werden dann in kleinen Gefäßen wie z.B. kleinen Milchfläschchen aufbewahrt, woraufhin die benutzten Glaskolben gereinigt und sterilisiert werden, so daß sie wieder einsetzbar sind.

Es sei noch erwähnt, daß bei einer anderen Milchmenge ein entsprechend größerer Glaskolben und/oder eine veränderte Drehzahl eingesetzt werden können, wobei sich die neuen Werte mit Hilfe des Temperaturfühlers jedoch leicht ermitteln lassen.

Die Vorrichtung 10 ist darüber hinaus nicht nur für den Einsatz in einer Klinik geeignet, sondern auch von Müttern zuhause einsetzbar. Darüber hinaus wird durch das Verfahren nicht nur die CMV-Infektiosität ausgeschlossen, auch andere infektiöse Mikroorganismen, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, können inaktiviert werden.

Die Ergebnisse der beispielhaft durchgeführten Inaktivierungen werden unten in den Beispielen 4 und 5 wiedergegeben.

Beispiel 2: Holder-Pasteurisierung

Zum Vergleich wurden Proben, wie sie auch im Beispiel 1 verwendet wurden, einer Holder-Pasteurisierung unterzogen, also jeweils für 30 Minuten auf 62,5°C erhitzt.

Die in den Beispielen 4 und 5 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß auch durch diese Holder-Pasteurisierung jegliche Virusinfektion eliminiert wird, die Holder-Pasteurisierung führt jedoch zu einer deutlichen Reduktion des Laktoferrins, wobei verglichen mit der Kurzzeithitzeinaktivierung aus Beispiel 1 die Lipaseaktivität, der eine Schlüsselrolle bei der Fettresorption im Frühgeborenenintestinum zugeschrieben wird, ca. um den Faktor 3 geringer ist.

Beispiel 3: Kryoinaktivierung

Als weiterer Vergleich wurde mit Proben wie in den Beispielen 1 und 2 eine Kryoinaktivierung durchgeführt, die Proben wurden für 18 h/3d/10d bei -20°C gelagert.

Die von den Erfindern der vorliegenden Anmeldung gemessene Rate der verbleibenden Infektiosität war auch bei zehntägiger Lagerung bei -20°C immer noch 20 %, was deutlich höher ist als in der Literatur beschrieben. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung führen dies darauf zurück, daß es den Meßmethoden bei den in der früheren Literatur beschriebenen Verfahren noch an der heute erreichbaren Empfindlichkeit gefehlt hat.

Beispiel 4: Überprüfung der Inaktivierung

Zum Nachweis der CMV-Infektiosität, der CMV-DNA und der CMV-RNA wird die Milch nach der Inaktivierung fraktioniert und für den Nachweis die zellfreie und fettarme Molkefraktion verwendet. Hamprecht et al., Detection of cytomegalovirus DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR, Journal of Virological Methods, 1998, Band 70, Seiten 167-176, beschreiben den Vorteil der Verwendung der Molkefraktion gegenüber der behandelten Nativmilch dahingehend, daß die Zytotoxizität der Nativmilch in Zellkultur die Meßergebnisse verfälscht.

Aus diesem Grund wurde für die Überprüfung der Inaktivierung die Molkepräparation nach Hamprecht et al., 1998, wie folgt verwendet:

1-2 ml der Muttermilch wird bei 400 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, die cremige Deckschicht wird verworfen und der trübe Überstand wird erneut bei 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach werden Zelltrümmer des Überstandes durch Zentrifugation bei 3200 x g für 10 Minuten gesammelt und der sich ergebende Überstand durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße (Sartorius) gefiltert. Die gefilterte Molke wird für in vitro Zellkulturassays verwendet.

Als Zellen werden humane Vorhautfibroblasten (HFF) eingesetzt mit einer Adhärenzzeit von 4-5 Stunden. Als Kulturträger dienen Mikrotiterplatten mit $2,5 \times 10^4$ HFF/Mikrokultur/100 µl MEM-5 & FCS als Medium. Je Probe wurden acht Replika eingesetzt.

Je 100 μ l der individuellen Molkepräparation wurden zur Probeninokulation verwendet, die Adsorptionszeit betrug 2 h.

Vier Mikrokulturen wurden zum Nachweis von CMV-IEA (Immediate Early Gene Antigen; Phosphoprotein pp72) eingesetzt. Dieses Virusantigen wird zum Nachweis der Virusinfektiosität verwendet, es ist bereits 2-4 Stunden nach Virusinfekt in Fibroblasten Zellkernen nachweisbar.

Vier weitere Mikrokulturen dienten zum Nachweis von später CMV-RNA pp67 mRNA mittels einer Nucleic Acid Sequence-based Amplification, kurz NASBA, wie beschrieben von Compton, Nature, 350: 91-92, 1991. Durch dieses Verfahren ist es möglich, RNA in Gegenwart von DNA zu amplifizieren.

Nach einer Kurzzeit-Kultur (18 Stunden) lassen sich singuläre, diffus verteilte infizierte Zellkerne in der Mikrokultur nachweisen, sofern eine Infektion vorhanden ist.

Bei einer Langzeitkultur (5 d) bilden infizierte Zellkerne Plaques aus, die sich aus jeweils einer infizierten Fibroblastenzelle entwickeln.

Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Versuche aus den Beispielen 1-3 jeweils unter Angabe des Titers der Viruslösung, der Art der Inaktivierung, der Dauer des Zellkulturassays, der Anzahl der infizierten Zellen, der nachgewiesenen IE-DNA sowie der nachgewiesenen pp67 m-RNA, die im Gegensatz zur CMV-Infektion für eine CMV-Erkrankung steht.

TCID ₅₀ /100 µl	Probe	Inaktivierung	Assay	IEA+/Gesamt	IE-DNA	pp67 mRNA
10 ³	ZK-Kontrolle	-	15 h	76/76	./.	./.
	Molke spiked	-	15 h	22/103	./.	./.
	Molke spiked	10" 72°C	15 h	0/116	./.	./.
Spender CMV- seropositiv	Molke	-	5d	4/104	./.	./.
	Molke	10" 72°C	5d	0/120	./.	./.
	Molke	20" 72°C	5d	0/124	./.	./.
10 ⁴	ZK-Kontrolle	-	6d	-	+	+
	Molke spiked	-	6d	Konfl. Plaques	+	+
	Molke spiked	5" 72°C	6d	Ø/well	+	-
	Molke spiked	10" 72°C	6d	Ø/well	+	-
	Molke spiked	30' 62°C	6d	Ø/well	+	-
10 ³	ZK-Kontrolle	-	6d	-	+	+
	Molke spiked	-	6d	6 Plaques/well	+	+
	Molke spiked	5" 72°C	6d	Ø/well	+	-
	Molke spiked	10" 72°C	6d	Ø/well	+	-
10 ⁴	ZK-Kontrolle	-	5d	324/324	./.	./.
	Molke spiked	-	5d	24/77	./.	./.
	Molke spiked	3d-20°C	5d	45/333	./.	./.
	Molke spiked	10d-20°C	5d	73/361	./.	./.
10 ⁴	ZK-Kontrolle	-	18h	-	./.	./.
	Molke spiked	18h-20°C	18h	220/well	./.	./.

Tabelle 1: Ausgewählte Versuchsergebnisse zu den Beispielen
1-3

ZK-Kontrolle = Zellkultur- Kontrolle (ohne Probe)

Molke spiked = mit CMV AD 169 versetzte Molke

Sowohl bei der Holder-Pasteurisierung als auch bei der erfindungsgemäßen Kurzzeithitzeinaktivierung sind im Gegensatz zur Kryoinaktivierung weder Virusantigen (IEA) noch späte Virus-RNA (pp67 mRNA) mit der sehr empfindlichen NASBA-Methode nachweisbar. Virus-DNA wird jedoch nachgewiesen, deutet jedoch nicht auf eine verbleibende Infektion sondern lediglich auf die Hitzebeständigkeit der viralen DNA hin.

Dies bedeutet, daß durch die Kurzzeitinaktivierung die Infektiosität effektiv eliminiert wird.

Beispiel 5: Biochemische Parameter

Zur Charakterisierung der in den Beispielen 1 bis 3 beschriebenen Inaktivierungsverfahren wurden zusätzliche biochemische Parameter erfaßt, die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben.

	Kontrolle	Kurzzeit		Kryo			Holder
	Molke + CMV AD 169 unbehandelt	5° 72°C	10° 72°C	18h-20°C	3d-20°C	10d-20°C	30° 62°C
<u>CMV-IEA</u>							
Kerne (18h)	157/weil	Ø/weil	Ø/weil	220/weil	53/weil	32/weil	Ø/weil
Plaques (6d)	konfluent	Ø/weil	Ø/weil	konfluent	35 Plaques/ weil	29 Plaques/ weil	Ø/weil
<u>CMV-IE-DNA</u>							
nPCR (18h/6d)	+	+	+	+	+	+	+
<u>CMV pp67 mRNA</u>							
NASBA (18h/6d)	+	-	-	?	+	+	-
<u>Gesamt-Eiweiß</u>							
g/dl	1,07	1,07	1,07	1,06	1,07	1,05	1,07
<u>Albumin</u>							
g/dl	0,27	0,37	0,37	0,27	0,28	0,27	0,37
<u>Alkalische Phosphatase</u>							
U/l	28	Ø	Ø	30	32	30	Ø
<u>LDH</u>							
U/l	78	38	46	254	322	316	188
<u>Amylase</u>							
U/l	1242	1173	1215	1290	1281	1209	1122
<u>Lipase</u>							
U/l	2685	53	56	2583	2763	2697	18
<u>Vitamin B12</u>							
ng/dl	42	42	43	43	-	44	44
<u>Folsäure</u>							
ng/dl	550	697	735	875	-	-	1045
<u>sIgA</u>							
mg/l	1700	1200	1200	1700	1700	1700	1200

Tabelle 2: Biochemische Parameter von ausgewählten Ergebnissen der Beispiele 1-3

Inokulation: 10^4 TCID₅₀/100 µl AD 169 in Nativmilch
 Assay: 18 h (diffuse CMV-IEA-Kernfärbung);
 6d (Plaquesbildung)

Das Kurzzeithitzeinaktivierungsverfahren zeigt keine Reduktion des Gesamteiweisses und des Albumins in der Molke an. Temperatursensitiv ist dagegen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der Lipase. Die Lipaseaktivität, der eine Schlüsselrolle bei der Fettresorption im Frühgeborenenintestinum zugeschrieben wird, ist jedoch bei dem neuen Verfahren ca. um den Faktor 3 größer als nach der Holder-Pasteurisierung. Der Lipaseaktivität wird ferner eine wichtige antivirale Schutzwirkung zugeschrieben, so daß das neue Verfahren deutliche Vorteile gegenüber der Holder-Pasteurisierung aufweist.

Die Konzentration der Vitamine B12 und Folsäure wird durch das neue Verfahren nicht reduziert. Ferner zeigt sich, daß sIgA weitgehend hitzestabil ist, jedoch durch beide Hitzeinaktivierungsschritte geringfügig reduziert wird. Die Kryoinaktivierung beeinflußt den sIgA-Spiegel dagegen nicht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Behandlung von Milch, insbesondere von Muttermilch (32), bei dem die Milch in einem Behälter kurzzeitig erhitzt wird,

dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter zumindest während des Erhitzens derart in Bewegung gesetzt wird, daß sich an seiner Innenwand (29) ein Milchfilm (32) ausbildet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Milch für höchstens ca. 20 Sekunden auf oberhalb von mindestens ca. 65°C erhitzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter zumindest während des Erhitzens in Rotation versetzt wird mit einer Drehzahl oberhalb von ca. 150 U/min, vorzugsweise oberhalb von ca. 250 U/min, weiter vorzugsweise von ca. 300 U/min.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter/die Milch zum Aufheizen für eine erste Zeitspanne einer auf eine erste Temperatur installierten ersten Wärmequelle, dann für eine zweite Zeitspanne einer auf einer zweiten Temperatur befindlichen zweiten Wärmequelle und schließlich zum Abkühlen für eine

dritte Zeitspanne einer auf eine dritte Temperatur eingestellten dritten Wärmequelle ausgesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die erste und/oder dritte Wärmequelle ein Wasserbad (12, 13) aufweisen, in das der rotierende Behälter eingetaucht wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Wärmequelle die Umgebungsluft ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Temperatur größer als 80°C ist, vorzugsweise ca. $85\text{--}90^{\circ}\text{C}$ beträgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Temperatur kleiner als 10°C ist, vorzugsweise ca. $2\text{--}4^{\circ}\text{C}$ beträgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Zeitspanne größer als 15 Sekunden ist, vorzugsweise ca. 20–25 Sekunden beträgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Zeitspanne kleiner als 15 Sekunden ist, vorzugsweise ca. 5–10 Sekunden beträgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die dritte Zeitspanne größer als 10 Sekunden ist, vorzugsweise ca. 20 Sekunden beträgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter ein Glaskolben (24), vorzugsweise ein Glasrundkolben ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter ein Volumen aufweist, das mindestens ca. zehnmal größer ist als das Volumen der Milch.
14. Vorrichtung zur Behandlung von Milch, vorzugsweise von Muttermilch (32), in der die Milch in einem Behälter kurzzeitig erhitzt wird,

gekennzeichnet durch zumindest eine Wärmequelle zum Aufheizen der Milch und eine Vorrichtung, um den Behälter in Bewegung zu versetzen und den sich bewegenden Behälter der Wärmequelle für eine bestimmte Zeitspanne auszusetzen.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, gekennzeichnet durch eine weitere Wärmequelle zum Abkühlen der Milch.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Wärmequellen Wasserbäder (12, 13) sind, in die der sich bewegende, vorzugsweise rotierende Behälter durch die Vorrichtung wahlweise eintauchbar ist.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie dazu ausgebildet ist, das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 durchzuführen.

10

